

(15)

Wpływ polimorfizmów genu czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF-A na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF u chorych na wysiękową postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem

The effect of vascular endothelial growth factor VEGF-A gene polymorphisms and intravitreal anti-VEGF treatment outcomes in patients with exudative age-related macular degeneration

Agnieszka Kubicka-Trząska¹, Izabella Karska-Basta¹, Sylwia Dziedzina², Marek Sanak²,
Bożena Romanowska-Dixon¹

¹ Klinika Okulistyki i Onkologii Okulistycznej Katedry Okulistyki Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Bożena Romanowska-Dixon

² Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej II Katedry Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Marek Sanak

Abstrakt:

Cel: określenie związku między polimorfizmami genu kodującego czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF-A (rs2146323; rs699947) a ryzykiem wystąpienia wysiękowej postaci zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem oraz ocena ich wpływu na efekt leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF.

Materiał i metody: badaniami objęto 106 chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem leczonych doszkliskowymi iniekcjami ranibizumabu i/lub bevacizumabu. W ocenie skuteczności leczenia porównywano wyjściową najlepszą skorygowaną ostrość wzroku oraz grubość centralnej siatkówki zobrażowaną badaniem optycznej koherentnej tomografii z wynikami badań kontrolnych wykonywanych co miesiąc. Okres obserwacji wynosił 6 miesięcy. Grupę kontrolną stanowiło 60 osób, u których wykluczono zwyrodnienie plamki związane z wiekiem. Badania przeprowadzono z użyciem genotypowania technologią TaqMan firmy Applied Biosystems.

Wyniki: polimorfizm rs2146323 genu VEGF-A nie wykazał związku z rozwojem zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem, miał natomiast wpływ na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF. Osoby z genotypem CC w polimorfizmie VEGF-A rs2146323 lepiej reagowały na leczenie niż osoby z genotypem AC. Pod koniec okresu obserwacji u chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem, u których stwierdzono genotyp CC w polimorfizmie VEGF-A rs2146323, odnotowano lepszą ostateczną najlepszą skorygowaną ostrość wzroku i we wszystkich tych przypadkach istotną redukcję centralnej grubości siatkówki w porównaniu do odnośnych parametrów u osób bez tego genotypu [OR = 2,65, 95% CI (1,17–5,99); p = 0,0171]. U chorych niereagujących na leczenie lub reagujących słabo (25,47%) genotyp CC polimorfizmu rs2146323 występował w 28,85% przypadków, genotyp AC tego polimorfizmu natomiast – w 61,54% przypadków (p = 0,0128). Nie wykazano zależności między występowaniem polimorfizmu rs699947 VEGF-A a rozwojem zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem, jak i jego wpływu na wyniki leczenia u chorych z badanej grupy.

Wnioski: wyniki naszych obserwacji wykazały, że polimorfizmy rs2146323 oraz rs699947 VEGF-A nie mają wpływu na rozwój zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. Polimorfizm rs2146323 jednakże moduluje odpowiedź na leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF. Genotyp CC tego polimorfizmu kojarzy się z lepszą odpowiedzią, genotyp AC zaś jest związany ze słabą odpowiedzią na miejscowe leczenie antyangiogenne.

Słowa kluczowe:

czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, polimorfizm genowy, zwyrodnienie plamki związane z wiekiem.

Abstract:

Aim: To analyse the correlation between the rs2146323 and rs699947 polymorphisms of VEGF-A gene and the risk of age-related macular degeneration and response to anti-VEGF therapy in affected patients.

Material and methods: 106 patients with exudative age-related macular degeneration treated with intravitreal ranibizumab or bevacizumab were enrolled. Treatment response was assessed at 4-week intervals for 6 months and was based on the best corrected visual acuity and central retinal thickness compared to the baseline status. The control group included 60 subjects without age-related macular degeneration. Genetic testing (TaqMan Applied Biosystems) was performed in all cases.

Results: There was no correlation between the rs2146323 polymorphism of VEGF-A gene and age-related macular degeneration; yet, there was a correlation between this polymorphism and anti-VEGF treatment outcomes. Patients with CC genotype of rs2146323 VEGF-A polymorphism demonstrated significantly better treatment response. At the end of a follow-up, age-

-related macular degeneration patients with positive CC genotype of rs2146323 *VEGF-A* gene polymorphism had final better best corrected visual acuity and showed significant central retinal thickness reduction as compared to individuals negative for this genotype (OR = 2.65, 95% CI (1.17–5.99); $p = 0.0171$). Among the 25.47% of “non-responders”, genotype CC of rs2146323 *VEGF-A* was present in 28.85% of cases, while genotype AC was detected in 61.54% of cases ($p = 0.0128$). There was no correlation between rs699947 *VEGF-A* polymorphism and either age-related macular degeneration or response to anti-VEGF treatment.

Conclusions: The study showed that rs2146323 and rs699947 *VEGF-A* polymorphisms are not associated with increased risk of age-related macular degeneration. However, the rs2146323 *VEGF-A* polymorphism modulated the response to anti-VEGF therapy. Genotype CC of rs2146323 was associated with an improved response to anti-VEGF treatment, while patients with genotype AC of rs2146323 showed worse functional and anatomical response to anti-VEGF agents.

Key words:

vascular endothelial growth factor, genetic polymorphism, age-related macular degeneration.

Autorzy zgłaszają brak konfliktu interesów w związku z publikowaną pracą/ The authors declare no conflict of interest

Wprowadzenie

Śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) odgrywa kluczową rolę w regulacji angiogenezy, jest odpowiedzialny za wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz wykazuje aktywność prozapalną (1). Wszystkie te zjawiska są zaangażowane w etiopatogenezę i są odpowiedzialne za obraz kliniczny wysiękowej postaci zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (Age-related Macular Degeneration – AMD). Dowodem na istotne znaczenie czynnika VEGF w rozwoju AMD są stwierdzane w płynach wewnątrzgałkowych wysokie stężenia tego czynnika oraz wysoka ekspresja tej proteiny w usuwanych chirurgicznie błonach neowaskularnych (Choroidal Neovascularization – CNV) (2–4). Obecnie standardem leczenia wysiękowej postaci AMD są doszkliskowe iniekcje czynnika anty-VEGF (5, 6). Tę terapię charakteryzują wysokie skuteczność i bezpieczeństwo. Obserwuje się jednak pewne różnice w odpowiedzi na leczenie; około 20–30% chorych na wysiękową postać AMD nie reaguje na miejscową terapię antyangiogenną (7). Ponadto wyniki badań klinicznych wykazały różnice międzypopulacyjne w liczbie podanych iniekcji, koniecznych do uzyskania pełnej kontroli nad toczącym się procesem zwyrodnieniowym w plamce i pozwalających na utrzymanie korzystnego efektu anatomicznego oraz funkcjonalnego. Uważa się, że różna odpowiedź na leczenie antyangiogenne jest uzależniona od czynników genetycznych (8–10). Obecnie opisuje się 36 genów mających związek z rozwojem i progresją AMD (8). Na pierwszym miejscu należy wymienić geny kodujące białka układu dopełniacza: CFH (complement factor H), CFB (*complement factor B*), C2, C3 i CFI (*complement factor I*) (9). Równie ważnymi genami dla rozwoju AMD są: gen kodujący proteazę serynową zależną od wysokiej temperatury 1 (HTRA1 – *high temperature requirement A serine peptidase-1*) i gen wrażliwości rozwoju makulopatii związanej z wiekiem 2 (ARMS2 – *age-related maculopathy susceptibility-2*) (10). Pierwszy z nich reguluje aktywność komórkowego oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1 – *insulin-growth factor-1*), drugi koduje białko, którego funkcja nie została jeszcze poznana, po raz pierwszy wykryto go w łożysku, a następnie w komórkach siatkówki. Kolejne zidentyfikowane geny mające związek z AMD to: COL8A1/FILIP1L, IER3-DDR1, SLC16A8, TGFBR1, RAD51B, ADAMTS9, B3GALT1, VEGF-A (11). Opublikowane wyniki badań pokazały, że niektóre warianty ww. genów pełnią rolę nie tylko wskaźnika rozwoju i progresji choroby,

ale mogą być cennym markerem farmakogenetycznym, który pozwala przewidzieć odpowiedź na wdrożone leczenie antyangiogenne. Jednym z takich genów jest gen kodujący VEGF-A, zlokalizowany na chromosomie 6p21.3. *VEGF-A* jest zbudowany z 8 eksonów oraz 7 intronów (12, 13). Zidentyfikowano ponad 20 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs) w *VEGF-A*. Część z nich wykazuje dużą aktywność i reguluje ekspresję czynnika VEGF-A oraz modyfikuje jego właściwości angiogenne (14). Wydaje się zatem oczywiste, że różnorodność wariantów *VEGF-A* przekłada się na zróżnicowanie stopni ekspresji czynnika VEGF-A lub wariantów występowania tego białka, a to z kolei może decydować o odmiennej odpowiedzi na leki z grupy anty-VEGF (15). Najczęściej badanymi wariantami genowymi białka VEGF-A u chorych na AMD są polimorfizmy: rs699946, rs699947, rs2146323, rs833069, rs833070, rs1413711 i rs20110963 (16). Dotychczas uzyskane wyniki badań klinicznych jednak nie są jednoznaczne, a obserwowane w nich różnice wynikają m.in. z różnorodności badanej populacji.

Cel

Według przedstawionych powyżej założeń przeprowadzono badanie, którego celem była analiza występowania związku między wybranymi polimorfizmami genu kodującego czynnik VEGF-A (rs2146323, rs699947) a ryzykiem występowania wysiękowej postaci AMD (AMD) i jego określenie oraz wykazanie zależności między ww. wariantami genów a odpowiedzią na leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF.

Materiał i metody

Badaniami objęto 106 chorych na wysiękową postać AMD leczonych doszkliskowymi iniekcjami ranibizumabu i/lub bewaczumabu w Klinice Okulistyki i Onkologii Okulistycznej UJ CM w Krakowie w latach 2013–2015. Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z zasadami zawartymi w Deklaracji Helsińskiej. We wszystkich przypadkach przeprowadzono wstępne badanie okulistyczne obejmujące ocenę najlepszej skorygowanej ostrości wzroku (Best Corrected Visual Acuity – BCVA), pomiar ciśnienia wewnątrzgałkowego, ocenę przedniego odcinka i dna oka, wykonanie kolorowej fotografii dna oka (fundus kamera Topcon-TRC-50DX, Japonia), badanie centralnej grubości siatkówki (Central Retinal Thickness – CRT) w optycznej koherentnej tomografii (Optical Coherence Tomography – OCT) (Topcon

3D OCT 2000, Japonia) oraz angiografię fluoresceinową (Fluorescein Angiography – FA) (Topcon, TRC-50DX/A, Japonia). Badania kontrolne przeprowadzano co 4 tygodnie, a obejmowały one ocenę wszystkich parametrów badania wyjściowego z wyjątkiem wyników FA.

Leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF (ranibizumabem 0,5 mg/ 0,05 ml, bewacyzumabem 1,25 mg/ 0,5 ml) obejmowało dwie fazy: „nasycającą” – każdy chory otrzymywał trzy kolejne iniekcje czynnika anty-VEGF w odstępach miesięcznych, i „podtrzymującą” – leczenie prowadzono na podstawie wyniku badania klinicznego *pro re nata*, tj. „w razie potrzeby”.

Grupę kontrolną stanowiło 60 osób, które dobrano pod względem płci i wieku spośród osób operowanych w naszej klinice z powodu zaćmy starczej, u których wykluczono obecność AMD oraz innych schorzeń okulistycznych. W przeprowadzonych wywiadach lekarskich, zebranych zarówno od badanych z grupy chorych na AMD, jak i od badanych z grupy porównawczej, nie stwierdzono rodzinnego występowania chorób dziedzicznych i nowotworowych.

Protokół badania uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej UJ (zgodą nr 122.6120.214.2016). Od każdego uczestnika uzyskano świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu oraz pobrano jednorazowo do oznaczeń genetycznych 4,5 ml pełnej krwi (Vacutainer K3EDTA). Z uzyskanego z tego materiału DNA zbadano polimorfizmy *VEGF-A* rs2146323 oraz rs699947.

Isolacja DNA

Do pełnej krwi dodawano 6-procentowy roztwór wielkocząsteczkowego dekstranu (Dextran T500, Pharmacia) w celu sedymentacji erytrocytów. Bogate w leukocyty osocze odciągano i wirowano przez 10 min/20000 x g. DNA izolowano z osadu leukocytów metodą Chomczyński i Sacchi (DNAzol 0,4 ml, Applied Biosystems). Ta metoda polega na lizie komórek izotiocyanianem guanidyny, który dzięki rozbiciu wiązań wodorowych powoduje całkowite uwolnienie DNA z kompleksów jądrowych z białkami histonowymi. Po precipitacji DNA i przemyciu roztworem etanolu DNA było przechowywane w temperaturze -20°C w postaci roztworu wodnego.

Genotypowanie metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym

DNA było amplifikowane w obecności swoistych starterów oraz sond oligonukleotydowych wyznakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Podczas reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym („real-time PCR”) była rejestrowana fluorescencja w dwóch kanałach barwnych odpowiadających użytym sondom swoistym dla każdego z genotypowanych wariantów nukleotydowych. Użyto komercyjnych zestawów starterów i sond TaqMan (TaqMan TaqMan Genotyping Assays). Reakcja amplifikacji była przeprowadzana na płytach 96-dółkowych w termocyklerze 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Wykorzystano komercyjną mieszaninę reakcyjną zawierającą roztwory substratów i polimerazy; TaqMan Universal Genotyping PCR Master Mix, mieszaninę oligonukleotydowych starterów i sond oraz DNA połączono w objętościach zalecanych przez producenta i zgodnie z zaleconym profilem termicznym (TaqMan Universal Genotyping PCR Master Mix Protocol – Applied Biosystems).

Odczyty genotypów zbadanych polimorfizmów zostały dokonane na podstawie pomiaru intensywności fluorescencji automatycznie, z wykorzystaniem oprogramowania SDS wersja 2.04 (Applied Biosystems).

Analiza statystyczna

W badanych grupach istotność różnic między częstością alleli i genotypów oceniano za pomocą testu Chi². Analizę związku genotypów zbadanych polimorfizmów z występowaniem AMD przeprowadzono z wykorzystaniem modelu regresji logistycznej. Dla każdej pary obliczano wartość ilorazu szans (*odds ratio* – OR) oraz przedział ufności (95% PU). Wartości OR były następnie korygowane pod względem potencjalnych czynników zakłócających i podawane jako OR skorygowane. Analizę statystyczną i opracowanie wyników przeprowadzono za pomocą oprogramowania STATISTICA 10.0. Wartości $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotne.

Wyniki

W tabeli I przedstawiono szczegółową charakterystykę badanych z grupy chorych na AMD oraz z grupy porównawczej.

W tabeli II przedstawiono rozkład częstości genotypów i alleli dla dwóch zbadanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu *VEGF-A* rs2146323 i rs699947, a także wyniki regresji logistycznej w postaci skorygowanego OR u badanych z grupy chorych na AMD w odniesieniu do tego wskaźnika u badanych z grupy porównawczej. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w występowaniu poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów czynnika VEGFA między badanymi grupami, tj. grupą chorych na AMD i grupą chorych na zaćmę starczą stanowiącą grupę odniesienia. W przypadku ocenianych polimorfizmów VEGFA rs699947 oraz VEGFA rs2146323 u badanych z obu grup najczęściej stwierdzano obecność genotypu AC. To sugeruje brak związku między obecnością wariantów *VEGF-A* rs2146323 i rs699947 a ryzykiem zachorowania na wysiękową postać AMD (tab. II).

Na podstawie obserwacji postępu w leczeniu odnotowanego w czasie 6 miesięcy trwania badania stwierdzono natomiast, że polimorfizm rs2146323 miał wpływ na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF. Osoby z genotypem CC dla rs2146323 lepiej reagowały na leczenie, podczas gdy u chorych, u których stwierdzono występowanie genotypu AC, odpowiedź była gorsza. Pod koniec okresu obserwacji chorzy na AMD, u których stwierdzono genotyp CC rs2146323, wykazali ostateczną lepszą BCVA i we wszystkich tych przypadkach odnotowano istotną redukcję CRT w porównaniu do odnośnych parametrów u osób nieposiadających tego genotypu [OR = 2,65, 95% CI (1,17–5,99); $p = 0,0171$], chorzy z genotypem AC natomiast mieli gorszą BCVA oraz wykazano u nich istotnie mniejszą redukcję CRT niż u osób bez tego polimorfizmu [OR = 0,28, 95% CI (0,13–0,65); $p = 0,0023$] (tab. III). Jednocześnie wykazano, że u chorych z genotypem CC rs2146323 podano średnio o 1,3 iniekcji doszkliskowej mniej niż u osób bez tego genotypu.

W okresie 6-miesięcznej obserwacji u 27 chorych (25,47%) obserwowano brak pozytywnej odpowiedzi na prowadzone miejscowe leczenie antyangiogenne. Pomimo leczenia nie uzyskano u nich poprawy funkcji leczonego oka, jak również poprawy morfologii dołka w badaniu OCT (ryc. 1., 2.). Za brak popra-

wy funkcji uznawano brak poprawy BCVA lub jej pogorszenie w stosunku do wyników badania wyjściowego o co najmniej 1 linię wg tablic Snellena. Parametrami, za pomocą których oceniano morfologię dołka, były wartości pomiaru CRT oraz wyniki oceny ilości płynu śródsiatkówkowego pod częścią neurosensoryczną siatkówki oraz pod nabłonkiem barwnikowym siatkówki (Retinal Pigment Epithelium – RPE). Brak dobrego efektu leczenia definiowano jako brak zmian w wartościach CRT lub reduk-

cję CRT o mniej niż 50,0 μm , utrzymujące się obrzęk płamki oraz płyn pod RPE i pod częścią neurosensoryczną siatkówki. Genotyp CC rs2146323 *VEGF-A* miało 28,85% tych chorych nieodpowiadających na leczenie lub odpowiadających na nie słabo, genotyp AC zaś – aż 61,54% chorych ($p = 0,012$) (tab. IV).

Nie wykazano zależności między występowaniem polimorfizmu rs699947 *VEGF-A* a wynikami leczenia pacjentów z badanej grupy (tab. V).

Badana cecha/ Studied characteristic	Grupa AMD/ AMD group liczba/ number n = 106	Grupa porównawcza/ Control group liczba/ number n = 60	Wartość p/ p value
Płeć/ Sex			0,020
kobiety/ females	70 (66%)	30 (53%)	
mężczyźni/ males	36 (34%)	28 (47%)	
Wiek/ Age	56–90 lat (śr. 71,2)	54–88 lat (śr. 68,4)	0,023
≤ 60 lat/ ≤ 60 years	13 (12,3%)	11 (18,9%)	
> 60 lat/ > 60 years	93 (87,7%)	47 (81,1%)	
Palenie tytoniu/ Smoking			0,089
obecnie/ w przeszłości / current/ former	31 (29%)	15 (25,8%)	
nigdy/ never	75 (71%)	43 (74,2%)	
Miejsce zamieszkania/ Living environment			0,017
miasto/ urban	74 (69,8%)	36 (62%)	
wieś/ rural	32 (30,2%)	22 (38%)	
Wywiad rodzinny/ Family history of AMD			0,003
pozytywny/ positive	24 (22,64%)	4 (4%)	
negatywny/ negative	82 (77,35%)	54 (96%)	

Tab. I. Charakterystyka chorych na AMD i badanych z grupy porównawczej.

Tab. I. Characteristics of AMD patients and controls.

Polimorfizm genowy/ Gene polymorphism	Genotyp/ Genotype	Grupa porównawcza/ Control group n = 58	Grupa AMD/ AMD group n = 106	OR nieskorygowany (95% CI)/ Unadjusted OR (95% CI)	OR skorygowany (95% CI)/ Adjusted OR (95% CI)	p
VEGFA rs699947	AA	16 (26,23%)	30 (28,85%)	1,11 (0,54–2,29)	1,15 (0,56–2,28)	0,764
	AC	29 (48,33%)	52 (50,00%)	1,06 (0,56–2,03)	1,08 (0,58–2,13)	0,837
	CC	15 (25,00%)	22 (21,15%)	0,80 (0,38–1,71)	0,80 (0,38–1,71)	0,570
VEGFA rs2146323	AA	6 (9,84%)	13 (12,50%)	1,29 (0,46–3,61)	1,31 (0,44–3,65)	0,630
	AC	32 (52,46%)	49 (47,12%)	0,83 (0,44–1,58)	0,83 (0,44–1,58)	0,574
	CC	23 (37,7%)	42 (40,38%)	1,09 (0,57–2,10)	1,09 (0,57–2,10)	0,795

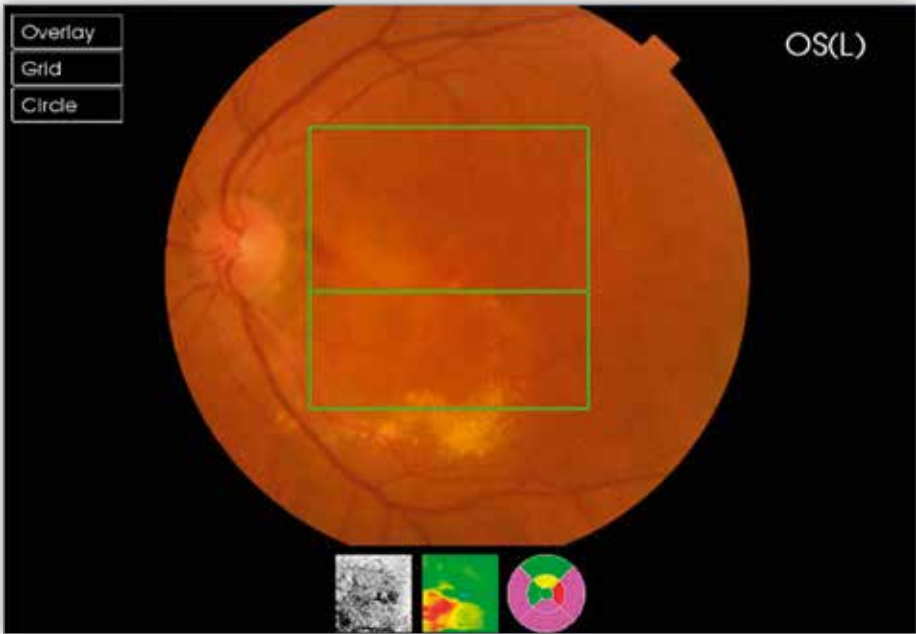
Tab. II. Rozkład genotypów i alleli dwóch badanych polimorfizmów genu VEGF-A rs2146323 oraz rs699947, a także wartości otrzymane dla analizy ilorazu szans (*odds ratio* – OR) u badanych z grupy chorych na AMD w odniesieniu do wartości u badanych z grupy porównawczej.

Tab. II. Distribution of genotypes and alleles of the rs2146323 and rs699947 polymorphisms of VEGF-A; odds ratio (OR) and its statistical significance for a comparison between AMD patients and controls.

Polimorfizm VEGFA rs2146323/ VEGFA rs2146323 polymorphism	Genotyp/ Genotype	OR nieskorygowany (95% CI)/ Unadjusted OR (95% CI)	OR skorygowany (95% CI)/ Adjusted OR (95% CI)	Wartość p/ p value
	CC	2,65 (1,17–5,99)	2,41 (1,11–5,75)	0,017
	AC	0,28 (0,13–0,65)	0,34 (0,11–0,57)	0,002
	AA	1,88 (0,58–6,12)	1,65 (0,52–5,98)	0,289

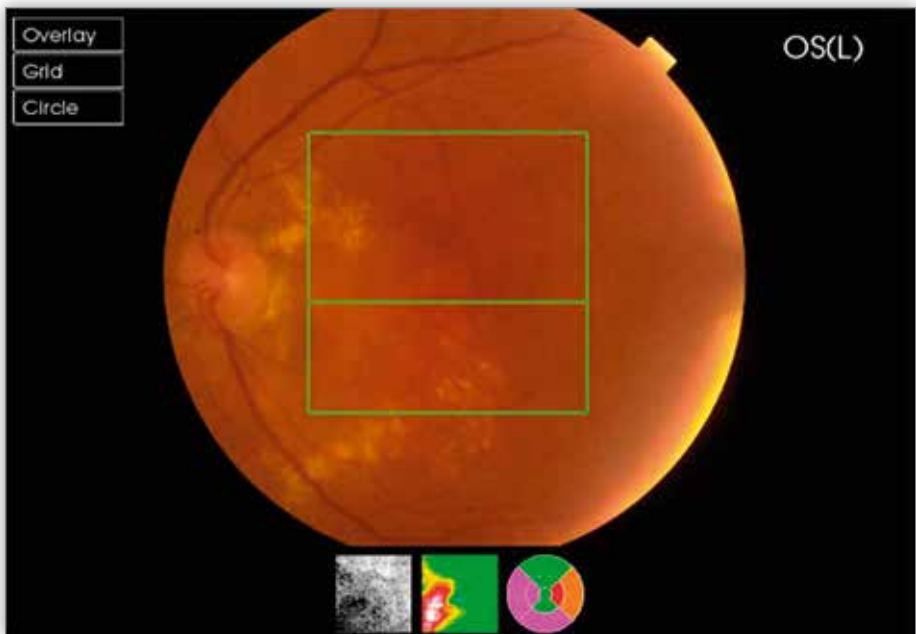
Tab. III. Rozkład genów i alleli polimorfizmu rs2146323 VEGF-A oraz analiza ilorazu szans (*odds ratio* – OR) u badanych z grupy chorych na AMD i z grupy porównawczej.

Tab. III. Distribution of genotypes and alleles of rs2146323 polymorphism of VEGF-A and odds ratio (OR) in AMD patients and controls.



Ryc. 1. Wyjściowe badanie optycznej koherentnej tomografii (OCT) – morfologia dołka w oku przed rozpoczęciem leczenia doszklistkowymi iniekcjami czynnika anti-VEGF.

Fig. 1. Optical coherence tomography (OCT) at baseline – foveal scan prior to intravitreal anti-VEGF treatment commencement.



Ryc. 2. Optyczna koherentna tomografia (OCT) plamki w 6. miesiącu obserwacji od podania 6 doszklistkowych iniekcji czynnika anti-VEGF (3 iniekcji bevacizumabu i 3 iniekcji ranibizumabu). Brak zmian w morfologii dołka.

Fig. 2. Optical coherence tomography (OCT) scan of macula after six intravitreal injections of anti-VEGF agents (3 bevacizumab and 3 ranibizumab injections).

	Genotyp/ Genotype	Słaba reakcja na leczenie/ Poor treatment response	Pozytywna reakcja na leczenie/ Good treatment response	Wartość p/ p value
Polimorfizm VEGFA rs2146323/ VEGFA rs2146323 polymorphism	CC	15 (28,85%)	27 (51,92%)	0,012
	AC	32 (61,54%)	17 (32,69%)	0,012
	AA	5 (9,62%)	8 (15,38%)	0,213

Tab. IV. Rozkład genotypów polimorfizmu rs2146323 VEGF-A w zależności od reakcji na leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF u chorych z badanej grupy.

Tab. IV. Distribution of genotypes of rs2146323 polymorphism of VEGF-A in AMD patients by treatment response to anti-VEGF therapy.

	Genotyp/ Genotype	Słaba reakcja na leczenie/ Poor treatment response	Pozytywna reakcja na leczenie/ Good treatment response	Wartość p/ p value
Polimorfizm VEGFA rs699947/ VEGFA rs699947 polymorphism	CC	7 (11,54%)	15 (28,85%)	0,153
	AC	28 (53,85%)	24 (46,15%)	0,192
	AA	17 (32,96%)	13 (25,00%)	0,141

Tab. V. Rozkład genotypów polimorfizmu rs699947 VEGF-A w zależności od reakcji na leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF u chorych z badanej grupy.

Tab. V. Distribution of genotypes of rs699947 VEGF-A polymorphism depending on reaction to anti-VEGF therapy in AMD group.

Omówienie

Zbadane przez nas dwa polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w obrębie genu *VEGF-A*: rs2146323 oraz rs699947, zostały już wcześniej opisane jako odgrywające istotną rolę w patomechanizmie wielu schorzeń okulistycznych – np. retinopatii cukrzycowej, nowotworów złośliwych i wysiękowej postaci AMD (3). Polimorfizm rs2146323 jest zlokalizowany w obrębie regionu intronu 2. genu i pomimo to, że nie wpływa na sekwencję produkowanego polipeptydu, uczestniczy w regulacji jego ekspresji (2, 8). Wariant rs699947 *VEGF-A* natomiast znajduje się w regionie promotorowym genu, dlatego potencjalnie wpływa również na zmianę ekspresji tego białka, korelując ze zmiennym poziomem tego czynnika w surowicy i tkankach (2, 8).

Nie stwierdziliśmy w naszym badaniu, aby zachodził związek między występowaniem polimorfizmu rs699947 a rozwojem AMD. Nasze obserwacje są zgodne z wynikami badań przeprowadzonych z udziałem populacji holenderskiej, angloceltyckiej, hinduskiej oraz hiszpańskiej (17–21).

Dotychczasowe wyniki badań nad zależnością między polimorfizmem rs699947 *VEGF-A* a odpowiedzią na leczenie anty-angiogenne u chorych na AMD są niejednoznaczne. Część wyników badań dowodzi istnienia związku farmakogenetycznego między polimorfizmem rs699947 a wynikami leczenia. Przykładem mogą tu być wyniki obserwacji niektórych badaczy – np. Habibi i wsp. oraz Imai i wsp. wykazali, że osoby z genotypem AA lepiej reagowały na leczenie doszkliskowymi iniekcjami bevacyzumabu (22, 23). Podobne obserwacje poczynili Park i wsp. oraz Cruz-Gonzales i wsp., oni również odnotowali, że na leczenie lepiej reagowali chorzy z genotypem AA w polimorfizmie rs699947 *VEGF-A* (19, 24). Ciekawe spostrzeżenia zostały zawarte w metaanalizie obejmującej 8 publikacji dotyczących zależności między ośmioma najczęściej występującymi polimorfizmami *VEGF-A* (rs699946, rs699947, rs833069, rs833070, rs1413711, rs2010963, rs2146323) a odpowiedzią na leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF (16). Wu i wsp.

wykazali, że genotyp AA rs699947 był związany z lepszą reakcją na leczenie, ale tylko w populacji azjatyckiej, u Europejczyków zaś takiej zależności nie stwierdzono (16). Zupełnie odmienne obserwacje poczynili Lazzeri i wsp. oraz Kitchens i wsp., którzy stwierdzili, że genotyp AA jest odpowiedzialny za brak pozytywnej reakcji na leczenie anty-VEGF (25, 26). Jeszcze inne spostrzeżenia poczynili badacze tureccy, którzy nie wykazali żadnego związku między odpowiedzią na leczenie a występowaniem polimorfizmu *VEGF-A* rs699947 u chorych na wysiękową postać AMD (27).

Wyniki metaanalizy pokazały, że spośród wszystkich badanych polimorfizmów genowych jedynie polimorfizm *VEGF-A* rs833061 był związany z pozytywną reakcją na leczenie anty-VEGF. Nasze badania, których wyniki przedstawiamy w tej pracy, nie obejmowały genotypowania tego polimorfizmu. Badacze podkreślają, że pozytywna reakcja na leczenie u chorych na wysiękową postać AMD z analizowanych populacji była prawdopodobnie związana ze zmniejszoną ekspresją czynnika *VEGF-A* u homozygot CC rs833061 (16).

U badanych przez nas chorych genotyp AA rs699947 nie miał żadnego wpływu na przebieg leczenia, korzystny wpływ natomiast miał genotyp CC rs2146323, a genotyp AC promował słabą odpowiedź na leczenie. Zbyt mała liczebność grup chorych z genotypem AA tego polimorfizmu uniemożliwiła przeprowadzenie analizy statystycznej dla tej klasy genotypowej. Pojedyncze doniesienia wskazują na istnienie zależności między polimorfizmem rs2146323 a rozwojem wysiękowej postaci AMD i jej przebiegiem klinicznym (28). Wyniki większości badań jednak nie potwierdzają tej obserwacji (29–31). Podobne spostrzeżenia przedstawili w swojej metaanalizie Wu i wsp., którzy m.in. wykazali, że wariant rs2146323 polimorfizmu *VEGF-A* nie miał wpływu na wyniki leczenia wszystkich chorych na AMD z analizowanych populacji ($p > 0,05$) (16). Hagstrom i wsp. u chorych uczestniczących w badaniu CATT (Comparison of AMD Treatments Trials), u których oceniano i analizowano

występowanie siedmiu polimorfizmów genu *VEGF-A* (rs699946, rs699947, rs833069, rs833070, rs1413711, rs2010963, rs2146323) oraz polimorfizmu *VEGFR-2* (rs2071559), nie stwierdzili farmakogenetycznego związku między ww. wariantami genów *VEGF-A* i *VEGFR-2* a wynikami leczenia (32). U chorych z naszej grupy badanych też nie wykazaliśmy związku między występowaniem polimorfizmu rs2146323 a rozwojem AMD. Wyniki naszych badań są zatem zbieżne z częścią opublikowanych wyników badań nad udziałem rs2146323 w mechanizmie rozwoju AMD. Należy również podkreślić, że AMD jest chorobą wieloczynnikową, o jej rozwoju i przebiegu decyduje nie jeden polimorfizm genowy, lecz zjawisko kumulacji efektów wielu alleli ryzyka rozwoju tego schorzenia.

Różnice w wynikach badań mogą wynikać z różnej liczebności badanych grup, różnic w zaawansowaniu choroby w badanych populacjach, różnic w kryteriach oceny skuteczności leczenia, a przede wszystkim z różnic etnicznych badanych.

Ciekawym spostrzeżeniem przytaczanym w naszej pracy jest podobne występowanie polimorfizmów *VEGFA* rs699947 oraz *VEGFA* rs2146323 u badanych z grupy chorych na AMD oraz z grupy porównawczej, którą stanowili chorzy na zaćmę starczą. W dostępnej literaturze przedmiotu nie znaleźliśmy żadnej publikacji na temat oceny występowania polimorfizmów *VEGFA* u chorych na zaćmę, w przyszłości to zagadnienie może być ciekawym tematem dalszych badań.

Podsumowanie

Wyniki naszych obserwacji wykazały, że polimorfizmy rs2146323 i rs699947 genu *VEGF-A* nie mają wpływu na ryzyko zachorowania na AMD. Obecność polimorfizmu rs2146323 *VEGF-A* może modulować odpowiedź na leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF. Nasza praca ma pewne ograniczenia; oceniliśmy tylko dwa polimorfizmy genowe *VEGF*. Dlatego zamierzamy kontynuować nasze badania i rozszerzyć analizowane polimorfizmy genu *VEGF-A* o kolejne warianty.

Uważamy, że analiza wariantów genetycznych promujących rozwój AMD i mających wpływ na wyniki leczenia wysiękowej postaci AMD może być cennym narzędziem do wczesnego zidentyfikowania chorych „opornych” na terapię antyangiogenną.

Z powodu dużej rozbieżności wyników dotychczas przeprowadzonych badań klinicznych, wskazujących na zróżnicowany wpływ badanych polimorfizmów genowych czynnika *VEGF-A* na rozwój AMD oraz na rezultaty leczenia zależne od badanej grupy chorych, wskazane wydaje się stworzenie indywidualnego i swoistego dla danej populacji docelowej panelu badań genetycznych.

Praca powstała w ramach programu statutowego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum
nr K/ZDS/006284.

Piśmiennictwo:

1. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med. 2003; 9(6): 669–676.
2. Barchitta M, Maugeri A: *Association between Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms and Age-Related Macular Degeneration: An Updated Meta-Analysis*. Disease Markers. 2016; 2016, ID 8486406, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8486406>.

3. Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnett ME: *Vascular endothelial growth factor in eye disease*. Prog Retin Eye Res. 2008; 27(4): 331–371.
4. Grisanti S, Zhu Q, Tatar O, Lueke J, Lueke M, Tura A, et al.: *Differential expression of vascular endothelial growth factor-a isoforms in neovascular age-related macular degeneration*. Retina. 2015; 35(4): 764–772.
5. Martin DF, Maguire MG, Ying G, Grunwald JE, Fine SL, Jaffe GJ, et al.: *Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration*. N Engl J Med. 2011; 364: 1897–1908.
6. Pożarowska D, Pożarowski P: *The era of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs in ophthalmology, VEGF and anti-VEGF therapy*. Cent Eur J Immunol. 2016; 41(3): 311–316.
7. Krebs I, Glittenberg C, Ansari-Shahrezaei S, Hagen S, Steiner I, Binder S: *Non-responders to treatment with antagonists of vascular endothelial growth factor in age-related macular degeneration*. Br J Ophthalmol. 2013; 97(11): 1443–1446.
8. Sergejeva O, Botov R, Liutkeviciene R, Kriauciuniene L: *Genetic factors associated with the development of age-related macular degeneration*. Medicina. 2016; 52: 79–88.
9. Francis PJ, Hamon SC, Ott J, Weleber RG, Klein ML: *Polymorphism in C2, CFB and C3 are associated with progression in advanced age-related macular degeneration associated with visual loss*. J Med Genet. 2009; 46: 300–307.
10. Akagi-Kurashige Y, Yamashiro K, Gotoh N, Miyake M, Morooka S, Yoshikawa M, et al.: *MMP20 and ARMS2/HTRA1 are associated with neovascular lesion size in age-related macular degeneration*. Ophthalmology. 2015; 122(9): 2295–2301.
11. Fritsche LG, Chen W, Schu M, Yaspan BL, Yu Y, Thorleifsson G, et al.: *Seven new loci associated with age-related macular degeneration*. Nat Genet. 2013; 45: 433–439.
12. Ferrara N: *Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor*. J Mol Med. 1999; 77: 527–543.
13. Goncalves FM, Martins-Oliveira A, Speciali JG, Izidoro-Toledo TC, Luizon MR, Dach F, et al.: *Vascular endothelial growth factor genetic polymorphism and haplotypes in women with migraine DNA*. Cell Biol. 2010; 327: 357–362.
14. Pasqualetti G, Danesi R, Del Tacca M, Bocci G: *Vascular endothelial growth factor pharmacogenetics a new perspective for anti-angiogenic therapy*. Pharmacogenomics. 2007; 8(1): 49–66.
15. Watson CL, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE: *Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene correlation with variation in VEGF protein production*. Cytokine. 2000; 12: 1232–1235.
16. Wu M, Xiong H, Xu Y, Xiong X, Zou H, Zheng M, et al.: *Association between VEGF-A and VEGFR-2 polymorphisms and response to treatment of neovascular AMD with anti-VEGF agents: a meta-analysis*. Br J Ophthalmol. 2016; 0:1–9. doi:10.1136/bjophthalmol-2016-309418.
17. Boekhoorn SS, Isaacs A, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Hoffman A: *Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and risk of age-related macular degeneration: the Rotterdam Study*. Ophthalmology. 2008; 115: 1899–1903.
18. Gupta D, Gupta V, Singh V, Prakash S, Agrawal S, Chawla S, et al.: *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and association with age related macular degeneration in Indian patients*. Meta Gene. 2016; 22(9): 249–253.

19. Cruz-Gonzalez F, Cabrillo-Estévez L, López-Valverde G, Cieza-Borrella C, Hernández-Galilea E, González-Sarmiento R: *Predictive value of VEGF A and VEGFR2 polymorphisms in the response to intravitreal ranibizumab treatment for wet AMD*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2014; 252(3): 469–475.
20. Cruz-González F, Cieza-Borrella C, Cabrillo-Estévez L, Cañete-Campos C, Escudero-Domínguez F, González-Sarmiento R: *VEGF A (rs699947 and rs833061) and VEGFR2 (rs2071559) gene polymorphisms are not associated with AMD susceptibility in a Spanish population*. Curr Eye Res. 2013; 38(12): 1274–1277.
21. Lin JM, Wan L, Tsai YY, Lin HJ, Tsai Y, Lee CC, et al.: *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration*. Am J Ophthalmol. 2008; 145(6): 1045–1051.
22. Habibi I, Sfar I, Chebil A, Kort F, Bouraoui R, Jendoubi-Ayed S, et al.: *Vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration in Tunisian population*. Biomark Res. 2014 Aug 18; 2:15. doi: 10.1186/2050-7771-2-15.
23. Imai D, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Awata T, Inoue S, et al.: *CFH, VEGF, and PEDF genotypes and the response to intravitreal injection of bevacizumab for the treatment of age-related macular degeneration*. J Ocul Biol Dis Infor. 2010; 3(2): 53–59.
24. Park UC, Shin IY, Kim SJ, Shin ES, Lee JE, McCarthy IC, et al.: *Genetic factors associated with response to intravitreal ranibizumab in Korean patients with neovascular age-related macular degeneration*. Retina. 2014; 34: 288–297.
25. Lazzeri S, Figus M, Orlandi P, Fioravanti A, Di Desidero T, Agosta E, et al.: *VEGF-A polymorphisms predict short-term functional response to intravitreal ranibizumab in exudative age-related macular degeneration*. Pharmacogenomics. 2013; 14(6): 623–630.
26. Kitchens JW, Kassem N, Wood W, Stone TW, Isernhagen R, Wood E, et al.: *A pharmacogenetics study to predict outcome in patients receiving anti-VEGF therapy in age related macular degeneration*. Clin Ophthalmol. 2013; 7: 1987–1993.
27. Kepez Yildiz K, Ozdek S, Ergun MA, Ergun S, Yaylacioglu Tunçay F, Elberg S: *CFH Y402H and VEGF polymorphisms and anti-VEGF treatment response in eductive age-related macular degeneration*. Ophthalmic Res. 2016; 56(3): 132–138.
28. Haines JL, Schmechel N, Schmidt S, Scott WK, Agarwal A, Postel EA, et al.: *Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF, VLDLR, and LRP6*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006; 47(1): 329–335.
29. Bulgu Y, Cetin GO, Caner V, Cetin EN, Yaylali V, Yildirim C: *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration in a Turkish population*. Int J Ophthalmol. 2014; 18, 7(5): 773–777.
30. Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, et al.: *VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration*. Hum Mol Genet. 2006; 15(19): 2955–2961.
31. Fang AM, Lee AY, Kulkarni M, Osborn MP, Brantley MA Jr.: *Polymorphisms in the VEGFA and VEGFR-2 genes and neovascular age-related macular degeneration*. Mol Vis. 2009; 15: 2710–2719.
32. Hagstrom SA, Ying GS, Pauer GJ, Huang J, Maguire MG, Martin DF: *VEGF-A and VEGFR-2 Gene Polymorphisms and Response to Anti-VEGF Therapy in the Comparison of AMD Treatments Trials (CATT)*. JAMA Ophthalmol. 2014; 132(5): 521–527.

Praca wpłynęła do Redakcji 18.04.2017 r. (KO-00117-2017)
Zakwalifikowano do druku 07.06.2017 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
dr hab. n. med. Agnieszka Kubicka-Trząska
Klinika Okulistyki i Onkologii Okulistycznej UJ CM
ul. Kopernika 38
31-501 Kraków
email: akubicka@onet.pl